



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 7/02, 14/035, A61K 38/10		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/42063
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Juli 2000 (20.07.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00140 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Januar 2000 (12.01.00) (30) Prioritätsdaten: 199 01 009.9 13. Januar 1999 (13.01.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUTZ, Karin [DE/DE]; Weinheimer Strasse 7, D-69493 Hirschberg (DE). HOPPE-SEYLER, Felix [DE/DE]; Hirtenaue 38, D-69118 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schtissler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: PEPTIDES FOR INHIBITING HBV CORE PROTEINS (54) Bezeichnung: PEPTIDE ZUR INHIBIERUNG VON HBV-CORE-PROTEINEN (57) Abstract The invention relates to peptides which are suitable for inhibiting HBV core proteins, to DNAs which code them and to the use of both, especially for inhibiting HBV replication. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide, die sich zur Inhibierung von HBV Core-Proteinen eignen, sie kodierende DNAs und die Verwendung beider, insbesondere zur Hemmung der HBV-Replikation.			

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Peptide zur Inhibierung von HBV-Core-Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide, die sich zur Inhibierung von HBV-Core-Proteinen eignen, sie kodierende DNAs und die Verwendung beider, insbesondere zur Hemmung der HBV-Replikation.

Infektionen mit Hepatitis B-Virus (HBV) stellen ein großes gesundheitliches Problem dar. Dies gilt insbesondere, wenn die HBV-Infektion chronischer Natur ist, d.h. eine chronische Hepatitis vorliegt, was häufig direkt zum Tode führt. Auch ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms vielfach durch eine chronische HBV-Infektion bedingt. Letztere kennzeichnet sich durch eine kontinuierliche Replikation von HBV in Leberzellen. Die HBV-Replikation findet dabei innerhalb des viralen, aus Core-Proteinen aufgebauten Kapsids statt, wobei die Core-Proteine in Kontakt mit den viralen Nukleinsäuren treten. Viele Versuche wurden unternommen, die HBV-Replikation zu hemmen. Bisher waren diese Versuche aber nicht zufriedenstellend.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die HBV-Replikation gehemmt werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Der Anmelder hat erkannt, daß HBV Core-Proteine an kurze Peptide binden. Er hat eine randomisierte Oligopeptid-Bibliothek, die zufallsgenerierte Peptid-Sequenzen umfaßt, mit einem "Peptid-Aptamer-System" gescreeent, in dem ein HBV Core-Protein als Screening-Probe verwendet wurde. Hierbei hat er gefunden, daß kurze Peptide, insbesondere die in Tabelle 1 aufgeführten, an HBV Core-Proteine binden. Ferner hat er

erkannt, daß sich diese Peptide eignen, HBV Core-Proteine, z.B. in ihrer Aktivität für die HBV-Replikation, zu inhibieren. Des weiteren hat er erkannt, daß durch diese Inhibierung eine Hemmung der HBV-Replikation erreicht werden kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Peptid bereitzustellen, das aus den in Tabelle 1 aufgelisteten Peptiden ausgewählt ist, wobei das Peptid eine Modifikation in der Sequenz von bis zu 40 %, insbesondere 20 % und ganz besonders 10 %, aufweisen kann.

Tabelle 1

15	C1-1:	NH ₂ -SFYSVLFLWG TCGGFSHSWY-COOH
	C1-2c:	NH ₂ -LCETVRFPV CFCSLYVICS-COOH
	C1-3:	NH ₂ -SCAPAWSPAP TVVFVALYVV-COOH
	C2-1:	NH ₂ -QWGMDSLIRL YLWESLGLLS-COOH
	C2-2:	NH ₂ -IHPLSRGNFF PHVRLMGWEWR-COOH
20	C2-3:	NH ₂ -GQALCAGVSL FADWLHESTL-COOH
	C2-4:	NH ₂ -LKHFDPRWPL MSLMSSWACM-COOH
	C2-5:	NH ₂ -PPLRKAFCWR CFNWLSTKRL-COOH
	C2-6:	NH ₂ -LRKSMLKVGR DVCYVSLWVF-COOH

Erfindungsgemäße Peptide eignen sich HBV Core-Proteine zu binden und in ihren Aktivitäten, z.B. in ihrer Aktivität für die HBV-Replikation, zu inhibieren.

Der Ausdruck "HBV Core-Proteine" umfaßt ein Core-Protein jeglichen HBV-Typs, insbesondere der HBV-Subtypen HBV adr und HBV ayw. Ein HBV Core-Protein kann eine Wildtyp-Sequenz oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Sequenz aufweisen. Ferner kann es in verkürzter Form vorliegen, d.h. es liegt nur in Form jenes Fragments vor, das für die HBV-Replikation, insbesondere die Bindung an die viralen Nukleinsäuren oder für den Kapsidaufbau, notwendig ist. Das Fragment kann auch in Mehrfachkopien innerhalb eines

Polypeptid-Moleküls vorliegen. Des weiteren kann ein HBV Core-Protein bzw. ein Fragment davon in Form eines Fusionsproteins vorliegen.

- 5 Erfindungsgemäße Peptide können durch übliche Verfahren, in denen Peptide hinsichtlich ihrer Bindung an HBV Core-Proteine getestet werden, bereitgestellt werden. Solche Verfahren sind z.B. das "Peptid-Aptamer-" oder "Bakteriophagen-Display"-Verfahren. Günstig ist es, das in den Beispielen beschriebene
- 10 "Peptid-Aptamer"-Verfahren zu verwenden, das eine Modifizierung des vorstehend erwähnten Verfahrens ist.

- Erfindungsgemäße Peptide können als solche oder in Verbindung mit anderen Stoffen, z.B. (Poly)peptiden, vorliegen. Die
- 15 Verbindung kann darin bestehen, daß die erfindungsgemäßen Peptide über Linker, z.B. Disulfidbrücken, mit den (Poly)peptiden verbunden sind. Auch können die erfindungsgemäßen Peptide mit den (Poly)peptiden fusioniert sein, wodurch die erfindungsgemäßen Peptide in Form von Fusions(poly)peptiden
- 20 vorliegen. Als (Poly)peptide für Fusions(poly)peptide bieten sich z.B. "Leader"-Peptide, wie Penetratin von Drosophila Antennapedia oder VP22 von HSV1 an, welche die Aufnahme der erfindungsgemäßen Peptide in Zellen fördern. Andererseits können Polypeptide, die über Linker mit dem erfindungsgemäßen
- 25 Peptid verbunden sind, z.B. Trägerproteine, wie Transferrin sein, die im Körper als nicht fremd angesehen werden. Auch können mehrere erfindungsgemäße Peptide gleichzeitig in Verbindung mit einem vorstehenden Stoff vorliegen.

- 30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, die für ein erfindungsgemäßes Peptid kodiert. Eine solche DNA kann in Vektoren, insbesondere Expressionsvektoren vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines
- 35 Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b oder pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 oder Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 oder

pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Ferner können für die Expression in tierischen Zellen Viren, z.B. Adenovirus, Vaccinia-Virus, Adeno-assozii-
5 ierter Virus (AAV) oder Retroviren, wie MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaIV), verwendet werden.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren.
10 Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

15 Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Peptid bzw. Polypeptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusions-
20 polypeptids exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA
25 exprimierte Peptid bzw. Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Peptid bzw. Fusionspolypeptid
30 gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem
35 vorstehenden (Fusions)polypeptid oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)polypeptid oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der

Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere isoliert und mit Myelomzellen fusioniert.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Peptide und/oder sie kodierende DNAs sowie übliche Hilfsstoffe enthält. Als Hilfsstoffe können z.B. Arzneimittelträger, Bindemittel, Sprengmittel, Gleitmittel, Lösungsmittel, Lösungsmittelvermittler, Freigabe-
10 Beschleuniger, Freigabe-Verzögerer, Emulgatoren, Stabilisatoren, etc. verwendet werden. Eine solche Zusammensetzung kann in üblicher Weise, z.B. oral oder parenteral, verwendet werden. Die geeignete Dosierung wird für den Einzelfall in üblicher Weise bestimmt.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine diagnostische Zusammensetzung, die ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide enthält. Mit einer solchen Zusammensetzung können HBV Core-Proteine nachgewiesen werden.
20 Dies kann genutzt werden, um HBV-assoziierte Erkrankungen, z.B. HBV-Infektionen, wie chronische HBV-Infektionen, insbesondere chronische Hepatitis, und hepatazelluläres Karzinom, nachzuweisen. Ein solcher Nachweis beinhaltet beispielsweise (a) Gewinnung einer Zellprobe von einem
25 Patienten, (b) Inkontaktbringung der Zellprobe mit einem erfindungsgemäßen Peptid unter Bedingungen, welche die spezifische Bindung des Peptids an ein HBV Core-Protein erlauben, und (c) Nachweis des Peptids. Dieser Nachweis kann durch Standardverfahren erfolgen. Beispielsweise können die
30 erfindungsgemäßen Peptide in Flüssigphase vorliegen oder an einen festen Träger gebunden werden und auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind dem Fachmann bekannt. Auch können die Peptide durch erfindungsgemäße Antikörper nachgewiesen
35 werden. Letztere eignen sich ferner dazu, den Therapieverlauf einer mit erfindungsgemäßen Peptiden behandelten HBV-assoziierten Erkrankung zu kontrollieren.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich HBV Core-Proteine zu binden und in ihren Aktivitäten, insbesondere in ihrer Aktivität für die HBV-Replikation, zu inhibieren. Damit kann die Replikation von HBV gehemmt werden. Ferner kann gegen
5 HBV-assoziierte Erkrankungen, z.B. HBV-Infektionen, wie chronische HBV-Infektionen, insbesondere chronische Hepatitis, und heptatozelluläres Karzinom, diagnostisch und therapeutisch vorgegangen werden. Desweiteren stellen die erfindungsgemäßen Peptide bzw. sie kodierende DNAs eine Basis dar, völlig neue
10 Wirkstoffe gegen vorstehende Erkrankungen zu entwickeln.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt schematisch das modifizierte "Peptid-Aptamer"-
15 System in *S. cerevisiae*. Dieses System umfaßt drei Komponenten: (1) das Zielprotein (HBV Core-Protein ic), das mit einer heterologen DNA-Bindungsdomäne (GAL4BD) fusioniert ist, (2) ein Peptid mit randomisierter Aminosäuresequenz, das an eine
20 transkriptionelle Aktivierungsdomäne (GAL4AD) fusioniert ist und (3) ein stabil integriertes Selektionsgen (prototrophe Selektionsmarker, wie ADE2), das in seinem Promotor die Erkennungssequenz für die DNA-Bindungsdomäne besitzt. Durch
25 Interaktion zwischen dem Peptid und dem Zielprotein entsteht ein synthetischer Transkriptionsfaktor, der durch die Transaktivierungsdomäne an die Erkennungssequenz im Promotorbereich des Selektionsgens bindet und durch die Transaktivierungsdomäne die
30 Transkription des Selektionsgens stimuliert. Unter Selektionsbedingungen (z.B. Adenin-negativen Nährböden) bilden nur jene Hefezellen Kolonien, die ein Peptid mit Affinität für das Zielprotein exprimieren (TrxA = *E. coli* Thioredoxin A; TAG = His-
35 Tag; NLS = nukleäres Lokalisationssignal).

Fig. 2 zeigt die Analyse von HBV Core-Protein bindenden Peptiden im "Peptid-Aptamer"-System. Durch Screening

von etwa 2×10^6 Hefezellen werden 9 positive Klone isoliert. Es werden Replika-Plattierungen der Hefekolonien (Masterplatte oben: 1-9 = positive Klone; K = zufällig ausgewählter Kontroll-Klon) unter Selektion auf ADE2 (GAL4-BS im Kontext des GAL2-Promotors), HIS3 (GAL4BS im Rahmen des GAL1-Promotors) und URA3 (GAL4-BS im Rahmen des SPO13-Promotors) durchgeführt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Screening nach HBV Core-Protein bindenden Peptiden

Es wird ein Verfahren verwendet, das sich von dem bekannten "Peptid-Aptamer"-System ableitet. Das Verfahren ist in Fig. 1 schematisch dargestellt.

Für das Screening nach HBV Core-Protein bindenden Peptiden wird eine randomisierte Oligopeptid-Expressionsbank für 20 Aminosäuren-lange Peptide mit zufälliger Sequenz hergestellt (Komplexität ca. 2×10^8 unterschiedliche Peptide). Kodons werden durch die Sequenz NNK definiert (N = G, A, T oder C; K = G oder C). Sie kodieren für alle 20 Aminosäuren, resultieren aber nur in einem Stop-Kodon. Als Expressionsvektor wird ein Hefe-Expressionsvektor, pADTrx, verwendet. Dieser enthält E.coli Trx A (Thioredoxin-Protein) aus pTrx (Invitrogen) und GAL4AD sowie den ADH-Promotor aus pAS2 bzw. pGAD424 (Clontech). Die Peptide werden im Rahmen der aktiven Schleife von Trx exprimiert. Dies hat folgende Vorteile:

- im Rahmen der Trx-Schleife ist die Präsentation der Peptide nach außen gewährleistet,
- konformell restringierte Peptide können Aminosäuren nach außen exponieren, die bei flexiblen Peptiden im intrazellulären Milieu möglicherweise nach innen gefaltet werden,
- konformell restringierte Peptide können hochaffine Peptide sein, die das Potential besitzen, auch in vivo als

effiziente Proteininhibitoren zu wirken.

Ferner wird ein Hefestamm, KF-1, verwendet. Dieser stammt von dem Hefe-

5 stamm PJ69-4A (vgl. James et al., Genetics 144 (1996), 1425) und erlaubt die Analyse von drei Selektionsmarkern: ADE2, HIS3 und URA3. Jeder der drei Selektionsmarker steht unter der transkriptionellen Kontrolle von GAL4-Bindungsstellen im Rahmen unterschiedlicher Promotoren. Der Selektionsmarker URA3
10 wird durch den SPO13-Promotor reguliert, der aus dem Hefestamm MaV103 (vgl. Vidal, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (93), 10315-10320) stammt, ein negativ-regulatorisches Element enthält und durch starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden kann. Ferner enthält der Hefestamm das E.coli β -Galaktosidase-(-Gal)-Gen als weiteren Marker, dessen
15 Aktivität leicht quantifizierbar ist und eine Abschätzung der in vivo Bindungsaffinität des Peptids an das HBV Core-Protein ermöglicht. Auch die Aktivierung des HIS3-Gen kann durch Titration mit 3'AT-(3-Amino- -1, 2, 4-Triazol) quantifiziert
20 werden.

Das HBV Core-Protein wird einem Screening mit vorstehendem System unterzogen. Hierzu wird es in Form eines es kodierenden Expressionsvektors bereitgestellt. Als Basisvektor dient pPC97
25 (vgl. Vidal et al. vorstehend), in dem die kodierende Sequenz eines HBV Core-Proteins (HBV Subtyp adr) inseriert ist. Aus ca. 2×10^6 Hefeklonen werden 9 Klone isoliert, die unter Selektion mit ADE2 ein Wachstum zeigen. Replika-Plattierungen und die Analyse der drei Selektionsmarker zeigen, daß 8 der 9
30 Klone auch unter Selektion mit HIS3 Wachstum zeigen (Fig. 2). Desweiteren zeigen 3 der isolierten Klone zusätzlich Wachstum unter URA3-Selektion, was unter den hier eingesetzten Bedingungen auf eine besonders hohe in vivo Affinität des entsprechenden Peptids für das HBV Core-Protein hinweist.

35

Zur weiteren Kontrolle werden aus den 9 Klonen die entsprechenden Peptid-Expressionsplasmide isoliert und nach erneuter Transformation in Hefe einem Rescreening unterzogen.

Das Rescreening zeigt eine komplette Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den vorstehenden Replika-Plattierungen (Fig. 2). Es zeigt sich, daß das Wachstum der Hefe von der Bindung der Peptide an das HBV Core-Protein abhängt.

5

Die Peptide der 9 Klone werden in ihrer Aminosäuresequenz bestimmt. Diese ist in Tabelle 1 angegeben.

**Beispiel 2: Inhibierung von HBV-Core-Proteinen durch
erfindungsgemäße
Peptide.**

5 Es wird das "VP 22-Shuttle-System" verwendet. Dieses beruht
darauf, daß das HSV1-VP 22-Protein von Zellen aufgenommen
wird, d.h. als Träger verwendet werden kann. Es werden
Fusionspolypeptide aus VP 22 und erfindungsgemäßen Peptiden,
z.B. dem Peptid C1-1 von Tabelle 1 hergestellt. Hierzu wird
10 der Expressionsvektor pCEP4 (Invitrogen) verwendet. In diesen
werden die DNA-Sequenzen der Peptide in Phase mit der DNA-
Sequenz von VP 22 inseriert. Die Peptide werden dabei im
Rahmen des E.Coli TrxA-Proteins expriemiert. Es werden
Expressionsplasmide, z.B. pCEP4-C1-1, erhalten.

15 Ferner werden HepG2-Hepatomzellen verwendet. Diese werden mit
den vorstehenden Expressionsplasmiden, z.B. pCEP4-C1-1, und
einem für HBV kodierenden Expressionsplasmid, RC-CMV
(Invitrogen)-HBV cotransfiziert. Es wird eine Analyse auf
20 HBV-Replikation durchgeführt (vgl. Sells et al., Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 84 (1987), 1005-1009). Hierzu werden Zellen
bzw. Überstände isoliert und einer SDS-Polyacrylamid-
Gelelektrophorese unterzogen. In einem Southern- bzw. Western
Blot-Verfahren werden HBV-Virus-
25 partikel bzw. Nukleinsäuren bestimmt.

Es zeigt sich, daß durch die erfindungsgemäßen Peptide die
Synthese von HBV-Viruspartikeln bzw. -Nukleinsäuren stark
gehemmt wird. Kontrollen, in denen keine HBV Core-Protein
30 spezifischen Peptide verwendet wurden, zeigen diese Hemmung
nicht. Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Peptide zur
Hemmung der HBV-Replikation.

Patentansprüche

1. Peptid, ausgewählt aus den folgenden Peptiden

5

NH₂-SFYSVLFLWG TCGGFSHSWY-COOH
NH₂-LCETVRFPV CFCSLYVICS-COOH
NH₂-SCAPAWSPAP TVVFVALYVV-COOH
NH₂-QWGMDSLIRL YLWESLGLLS-COOH
NH₂-IHPLSRGNFF PHVRLMGEWR-COOH
NH₂-GQALCAGVSL FADWLHESTL-COOH
NH₂-LKHFDPRWPL MSLMSSWACM-COOH
NH₂-PPLRKAFCWR CFNWLSTKRL-COOH
NH₂-LRKSMLKVGR DVCYVSLWVF-COOH

10

15

wobei das Peptid eine Modifikation in der Sequenz von bis zu 40 % aufweisen kann.

2. Peptid nach Anspruch 1, wobei das Peptid als Fusionspolypeptid vorliegt.

20

3. Peptid nach Anspruch 2, wobei das Fusionspolypeptid eine "Leader"-Sequenz umfaßt.

25

4. DNA, kodierend für das Peptid nach einem der Ansprüche 1 - 3.

5. Expressionsvektor, enthaltend die DNA nach Anspruch 4.

30

6. Antikörper, gerichtet gegen das Peptid nach einem der Ansprüche 1-3.

35

7. Zusammensetzung, umfassend ein oder mehrere Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 3, ein oder mehrere Expressionsvektoren nach Anspruch 5 und/oder einen oder mehrere Antikörper nach Anspruch 6 sowie übliche Hilfsstoffe.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Peptid als

Fusionspolypeptid vorliegt.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Fusionspolypeptid eine "Leader"-Sequenz umfaßt.

5

10. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 1 - 3, des Expressionsvektors nach Anspruch 5 oder der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 - 9 zur Inhibierung eines HBV Core-Proteins.

10

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Inhibierung eine Hemmung der HBV-Replikation umfaßt.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die HBV-Replikation bei einer HBV-assoziierten Erkrankung vorliegt.

15

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10-12, wobei die Inhibierung des HBV Core-Proteins zur Behandlung einer HBV-assoziierten Erkrankung erfolgt.

20

14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei die HBV-assoziierte Erkrankung eine chronische HBV-Infektion, eine chronische Hepatitis und ein hepatozelluläres Karzinom umfaßt.

25

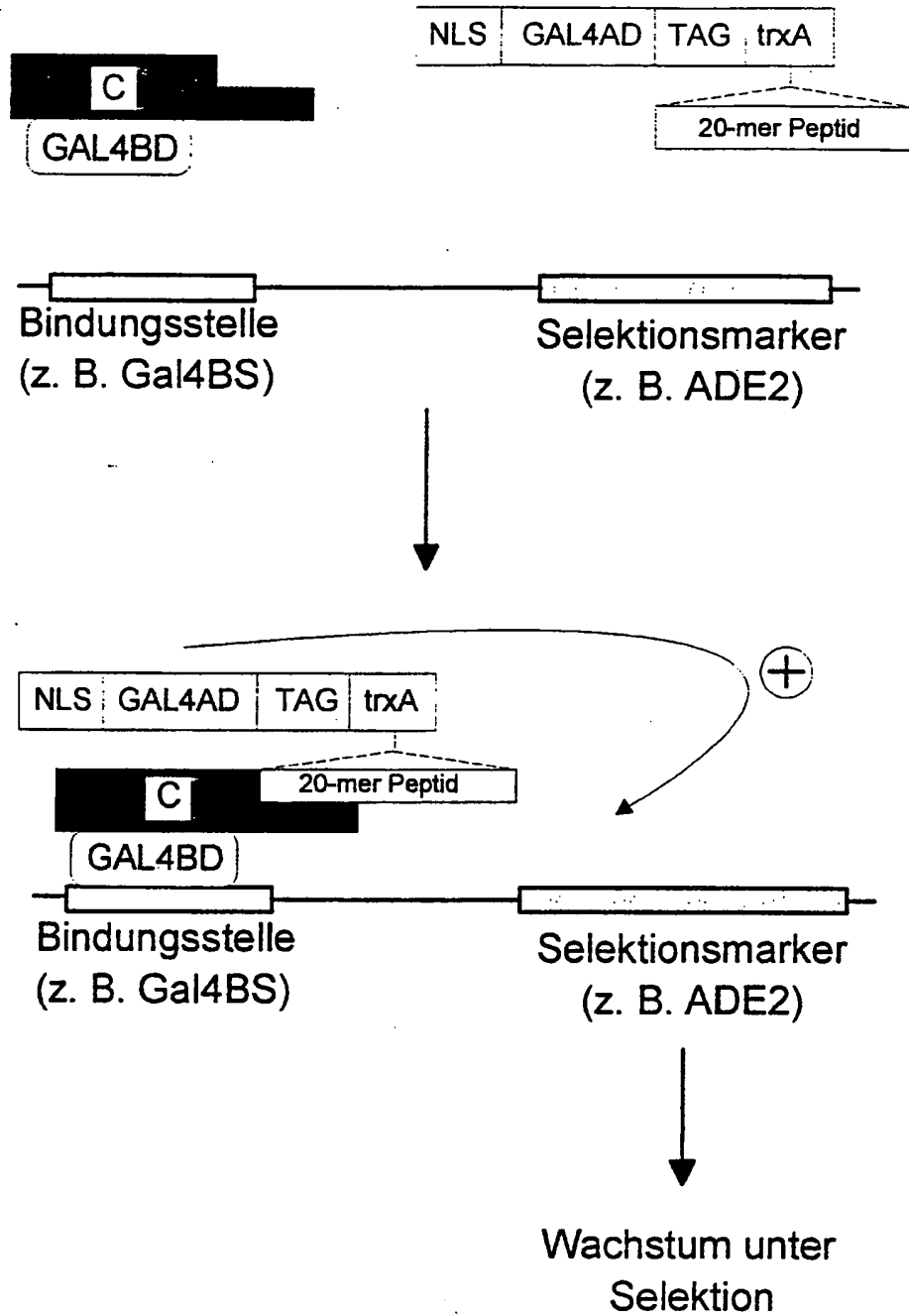


Fig. 1

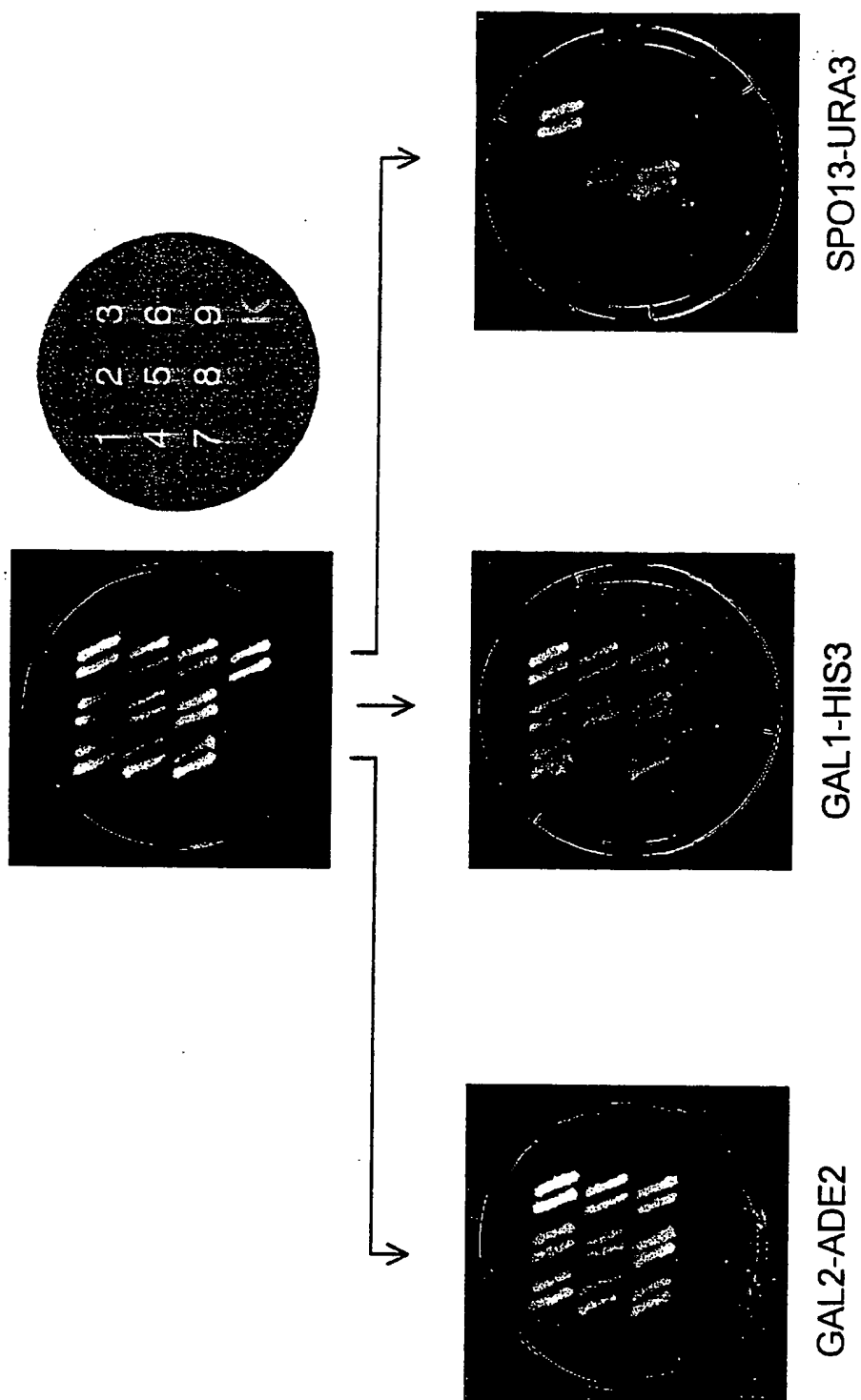


Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Peptide zur Inhibierung
von HBV-Core-Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 01 009.9-41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Ser Phe Tyr Ser Val Leu Phe Leu Trp Gly Thr Cys Gly Gly Phe Ser
1 5 10 15

His Ser Trp Tyr
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Leu Cys Glu Thr Val Arg Phe Trp Pro Val Cys Phe Cys Ser Leu Tyr Val
1 5 10 15

Ile Cys Ser
20

2

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Ser Cys Ala Pro Ala Trp Ser Pro Ala Pro Thr Val Val Phe Val Ala
 1 5 10 15

Leu Tyr Val Val
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Gln Trp Gly Met Asp Ser Leu Ile Arg Leu Tyr Leu Trp Glu Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Ser
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ile His Pro Leu Ser Arg Gly Asn Phe Phe Pro His Val Arg Leu Met
 1 5 10 15

Gly Glu Trp Arg
 20

3

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gly Gln Ala Leu Cys Ala Gly Val Ser Leu Phe Ala Asp Trp Leu His
1 5 10 15

Glu Ser Thr Leu
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Leu Lys His Phe Asp Pro Arg Trp Pro Leu Met Ser Leu Met Ser Ser
1 5 10 15

Trp Ala Cys Met
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Pro Pro Leu Arg Lys Ala Phe Cys Trp Arg Cys Phe Asn Trp Leu Ser
1 5 10 15

Thr Lys Arg Leu
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Leu	Arg	Lys	Ser	Met	Leu	Lys	Val	Gly	Arg	Asp	Val	Cys	Tyr	Val	Ser
1				5				10					15		

Leu	Trp	Val	Phe
			20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.